

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003 年12 月31 日 (31.12.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/000362 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 47/30, 47/34,  
9/127, 31/704, A61P 35/00(SHIMIZU, Kazuhisa) [JP/JP]; 〒371-0823 群馬県 前橋  
市 川曲町 2 2-1 5 Gunma (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/007730

(74) 代理人: 川口 義雄, 外 (KAWAGUCHI, Yoshio et al.);  
〒160-0022 東京都 新宿区 新宿 1 丁目 1 番 1 1 号 友  
泉新宿御苑ビル Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2003 年6 月18 日 (18.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,  
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ,  
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-178619 2002 年6 月19 日 (19.06.2002) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日  
本化薬株式会社 (NIPPON KAYAKU KABUSHIKI  
KAISHA) [JP/JP]; 〒102-8172 東京都 千代田区 富  
士見一丁目 1 1 番 2 号 Tokyo (JP). 独立行政法人  
科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECH-  
NOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川  
口市 本町 4 丁目 1 番 8 号 Saitama (JP). 桜井 靖久  
(SAKURAI, Yasuhisa) [JP/JP]; 〒168-0064 東京都 杉並  
区 永福 3-1 7-6 Tokyo (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中西 健 (NAKAN-  
ISHI, Takeshi) [JP/JP]; 〒273-0137 千葉県 鎌ヶ谷市 道  
野辺本町 2 丁目 1 1-7-1 0 6 Chiba (JP). 清水 和久2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING BLOCK COPOLYMER/DRUG COMPOSITE

(54) 発明の名称: ブロック共重合体-薬剤複合体の製造法

(57) Abstract: A process for producing a block copolymer/drug composite that can be industrialized, wherein neither dialysis nor ultrafiltration is performed and wherein halogenated hydrocarbons are not used. The process for producing a block copolymer/drug composite is characterized by comprising the steps of dissolving an AB type block copolymer composed of hydrophilic polymer structure moiety and hydrophobic polyamino acid structure moiety together with a drug in water or a mixed solvent of water and a low-boiling-point organic solvent miscible with water and concentrating the resultant solution.

(57) 要約: 透析や限外ろ過操作を行わず、又、ハロゲン化炭化水素を使用しないブロック共重合体-薬剤複合体の工業化可能な製造方法は知られていない。水、または水と混和する低沸点有機溶媒と水との混合溶媒に、親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるAB型ブロック共重合体と薬剤を溶解し、続いて溶液を濃縮する工程を含むことを特徴とするブロック共重合体-薬剤複合体の製造法を提供する。

WO 2004/000362 A1

## 明 細 書

## ブロック共重合体－薬剤複合体の製造法

## 技術分野

本発明は、親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるブロック共重合体が形成する高分子ミセルに薬剤を含有させブロック共重合体－薬剤複合体を得る際に、透析又は限外ろ過工程を含まないブロック共重合体－薬剤複合体の製造法等に関する。

## 背景技術

ポリエチレングリコール構造部分とポリアスパラギン酸誘導体部分からなるブロック共重合体が形成する高分子ミセルにドキシルピシンを含有させた高分子ブロック共重合体－薬剤複合体が特開平 7－6 9 9 0 0 号公報等に記載されており、遊離のドキシルピシンと比較して低い毒性の範囲で高い抗腫瘍効果を示すことが記載されている。該ブロック共重合体－薬剤複合体は、ブロック共重合体と薬剤をジメチルホルムアミド（DMF：

沸点 153 °C (101.3 kPa)) と水の混合溶媒中に溶解させた後、透析操作により有機溶媒であるジメチルホルムアミドを水に置換し、更に透析、限外ろ過操作により精製し製造されている。しかし、透析、限外ろ過操作を行うと、含有させた薬剤(例えばドキソルビシン)の一部も除去されてしまう(Drug Delivery System, 16, No.5, 401-408 (2001))。ため失われる薬剤は無駄となり、ブロック共重合体に対し含有薬剤量を多くすることができず、さらに含有量が連続的に変化するため含有薬剤量を一定にすることも困難である。加えて、透析および限外ろ過操作は共に実験室で行うには簡便な方法であるが、工業的に製造するには特別な設備が必要で、実際の製造には長時間を要する工程であり、工業的に現実性の高い実用的な製造法ではない。

又、特開 2001-226294 号公報には、ブロック共重合体と水難溶性薬物のクロロホルム溶液を水中で機械的攪拌や超音波照射等でエマルションとし、クロロホルムを蒸発除去する高分子ブロック共重合体-薬剤複合体の製造法が記載されているが、工場におけるクロロホルム等の使用には制限があり、水と混和しないハロゲン化炭化水素の使用という点も含めて工業的に実用的な方法ではない。

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

透析や限外ろ過操作を行わず、又、ハロゲン化炭化水素を使用しないブロック共重合体－薬剤複合体の工業的に製造可能な製造方法は知られておらず、また、ブロック共重合体に対して……含有薬剤量を高める実用的な方法もなく、従って、ブロック共重合体－薬剤複合体の実用的で新規な製造法が望まれていた。

### 課題を解決するための手段

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究の結果、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

(1) 水、または水と混和する低沸点有機溶媒と水との混合溶媒に、親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるＡＢ型ブロック共重合体と薬剤を溶解し、続いて溶液を濃縮する工程を含むことを特徴とするブロック共重合体－薬剤複合体の製造法；

(2) 製造工程に透析又は限外ろ過工程を含まない上記(1)

記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法；

(3) A B 型ブロック共重合体における親水性高分子構造部分がポリエチレンオキシド誘導体であり、疎水性ポリアミノ酸構造部分が側鎖カルボキシル基にアントラサイクリン系抗癌剤が結合したアスパラギン酸を含むポリアスパラギン酸である上記

(1) 又は (2) に記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法；

(4) A B 型ブロック共重合体における親水性高分子構造部分がポリエチレンオキシド誘導体であり、疎水性ポリアミノ酸構造部分が側鎖カルボキシル基にアントラサイクリン系抗癌剤が結合したグルタミン酸を含むポリグルタミン酸である上記

(1) 又は (2) に記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法；

(5) 疎水性ポリアミノ酸構造部分における側鎖カルボキシル基に結合したアントラサイクリン系抗癌剤がドキソルビシンである、上記 (3) 又は (4) に記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法；

(6) 薬剤がアントラサイクリン系抗癌剤である上記 (1) ～

(5) のいずれかに記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製

造法；

(7) アントラサイクリン系抗癌剤がドキシソルピシンまたはその塩である上記(6)記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法；

(8) 水、または水と混和する低沸点有機溶媒と水との混合溶媒に、親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるAB型ブロック共重合体と薬剤を溶解し、続いて溶液を濃縮し、更に凍結乾燥する工程を含むことを特徴とするブロック共重合体－薬剤複合体を含む凍結乾燥製剤の製造法；

に関する。

#### 発明の実施の形態

本発明のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法は、水、または水と混和する低沸点有機溶媒と水との混合溶媒に、親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるAB型ブロック共重合体と薬剤を溶解し、引き続いて溶液を濃縮する工程を含むことを特徴とし、特に透析又は限外ろ過操作を行わない方法である。

本発明において透析とは、半透膜を用い濃度差に基づく拡散

により低分子成分（有機溶媒や塩を含む）を除去する操作である。又、限外ろ過とは、限外ろ過膜（分画分子量：5000～50000）を用い溶液を濃縮しながらブロック共重合体－薬剤複合体中の低分子成分を除去する操作である。

本発明に使用される薬剤は特に限定されないが、本発明の複

合体は血管透過性に基づき腫瘍集積性に優れる点を有すること

から抗癌剤が好ましく、臨床に使用されている種々の抗癌剤が挙げられるが、特にアントラサイクリン系抗癌剤が好ましい。

アントラサイクリン系抗癌剤としては、例えばダウノルビシン、ドキソルビシン、ピラルビシン、アクリルビシン、エピルビシン、イダルビシン等が挙げられるが、特にドキソルビシンが好ましい。

本発明に使用される、親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるブロック共重合体における親水性高分子構造部分としては、通常知られている親水性を示す高分子化合物は全て含まれるが、具体的には例えば、ポリエチレンオキシド、ポリサッカライド、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等、又はそれらの誘導体等が挙げられ、特にポリエチレンオキシド誘導体が好

ましい。ポリエチレンオキシド誘導体として具体的には、例えば後記一般式 (I) における親水性高分子構造部分が挙げられる。

本発明における疎水性ポリアミノ酸構造部分とは、疎水性を示す  $\alpha$ -アミノ酸又は  $\beta$ -アミノ酸等若しくはそれらの誘導体等であれば特に限定されないが、側鎖カルボキシル基にアント

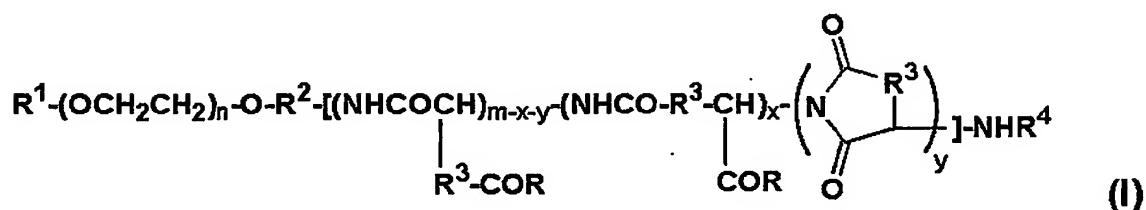
ラサイクリン系抗癌剤残基が結合したアミノ酸を含むポリアミノ酸が好ましい。

ポリアミノ酸として具体的には、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸等が挙げられる。側鎖カルボキシル基に結合したアントラサイクリン系抗癌剤残基としては、上記の本発明に使用される薬剤として挙げたアントラサイクリン系抗癌剤の残基が挙げられ、疎水性ポリアミノ酸としてはドキソルビシンの結合したアスパラギン酸を含むポリアスパラギン酸が特に好ましい。ブロック共重合体 1 分子中の疎水性ポリアミノ酸構造部分におけるアントラサイクリン系抗癌剤残基の重量割合は好ましくは 20% ~ 70% であり、より好ましくは 25% ~ 60% である。

又、本発明に使用される親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなる AB 型ブロック共重合体は、例えば特開平 7-69900 号公報や特開平 5-955 号公報等に記



載の方法に準じて製造されるものでもよい。即ち、片末端メトキシ基片末端アミノプロピル基ポリエチレングリコールと、 $\beta$ -ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無水物又は $\gamma$ -ベンジル-L-グルタメート-N-カルボン酸無水物を反応させ、得られるブロック共重合体の末端アミノ基をアシル化、側鎖ベンジルエステルをアルカリ加水分解し、生じる側鎖の遊離カルボン酸とアントラサイクリン系抗癌剤を縮合剤と反応助剤を用いて縮合して得られる。該公報の方法で製造されるブロック共重合体は、例えば下記一般式 (I) で表されるものと推定される。



一般式 (I) のポリアミノ酸構造部分における各構成部分の結合順は限定されずランダムでも規則的であってもよい。なお、式中 R は好ましくは水酸基又はアントラサイクリン系抗癌剤残基であり、 $R^1$  は好ましくは水素原子又は低級アルキル基、より好ましくは低級アルキル基であり、 $R^2$  は好ましくは低級アルキレン基であり、 $R^3$  は好ましくはメチレン基又はエチレン基であ

り、 $R^4$ は好ましくは水素原子又は低級アシル基、より好ましくは低級アシル基である。 $n$ は好ましくは5～1000の整数を示し、 $m$ は好ましくは2～300の整数を示し、 $x+y$ は好ましくは0～300の整数を示し、より好ましくは、 $n$ が80～300であり、 $m$ が20～50であり、 $x+y$ が0～50であ

り、但し、 $x+y$ は $m$ より大きくなることはない。 $x$ 及び $y$ は、  
上記条件を満たす整数であれば、0を含む如何なる値も取り得る。

$R$ としてのアントラサイクリン系抗癌剤残基におけるアントラサイクリン系抗癌剤としては、上記の本発明に使用される薬剤として挙げたアントラサイクリン系抗癌剤と同様であり、好ましいアントラサイクリン系抗癌剤も上記と同じくドキソルビシンである。

$R^1$ における低級アルキル基としては、好ましくは炭素数1～4の直鎖又は分岐アルキル基が挙げられ、具体的には、メチル基、エチル基、 $n$ -プロピル基、 $i$ -プロピル基、 $n$ -ブチル基、 $t$ -ブチル基等が挙げられ、より好ましくはメチル基である。

$R^2$ における低級アルキレン基としては、好ましくは炭素数1～4の直鎖又は分岐アルキレン基が挙げられ、具体的には、メチレン基、エチレン基、トリメチレン基、2-メチルトリメチ

レン基、テトラメチレン基等が挙げられ、より好ましくはトリメチレン基である。

$R^3$  は、好ましくはメチレン基又はエチレン基であって、より好ましくはメチレン基である。

$R^4$  における低級アシル基としては、好ましくは炭素数 1 ～ 4 のアシル基が挙げられ、具体的には、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基等が挙げられ、より好ましくはアセチル基である。

一般式 (I) のアントラサイクリン系抗癌剤残基とポリアミノ酸側鎖との結合様式は特に限定されないが、好ましくはアントラサイクリン系抗癌剤のアミノ基又は水酸基と、ポリアミノ酸の側鎖カルボン酸によるアミド結合又はエステル結合が挙げられ、特に好ましくはアントラサイクリン系抗癌剤のアミノ糖部分の 1 級アミノ基とポリアミノ酸のカルボン酸側鎖によるアミド結合が挙げられる。

一般式 (I) で表される親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるブロック共重合体において、特に好ましくは、 $R^1$  がメチル基、 $R^2$  がトリメチレン基、 $R^3$  がメチレン基、 $R^4$  がアセチル基、 $n$  が 80 ～ 300、 $m$  が 20 ～ 50、

$x + y$  が  $m$  より大きくない  $0 \sim 50$  であるブロック共重合体が挙げられる。

次に、本発明の製造法について説明する。親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなる AB 型ブロック共重合体を、水、又は水と混和する低沸点の有機溶媒と水との混合溶媒に溶解する。本発明における低沸点の有機溶媒とは、沸点が  $100^{\circ}\text{C}$  ( $101.3\text{ kPa}$ ) 以下の有機溶媒が挙げられ、好ましくは沸点が  $50^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$  ( $101.3\text{ kPa}$ ) の有機溶媒が挙げられ、水と混和する低沸点の有機溶媒としては具体的に、例えばメタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン等であり、ブロック共重合体を高濃度で溶解することができるエタノールが特に好ましい。混合溶媒における有機溶媒と水との比率はブロック共重合体が溶解すれば特に限定されないが、望ましくは  $1 : 9$  から  $9 : 1$ 、さらに望ましくは  $1 : 3$  から  $3 : 1$  である。また、このとき溶解を促進するために加温しても構わない。加温する際の温度はブロック共重合体が分解せず、安定性が保たれる範囲であればよく、望ましくは  $30^{\circ}\text{C} \sim 100^{\circ}\text{C}$ 、さらに望ましくは  $30^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$  である。

本発明の製造法において、水、又は水と混和する低沸点の有

機溶媒と水との混合溶媒中におけるブロック共重合体の濃度は、溶解していれば特に限定されないが、通常 2 % ~ 10 % が好ましい。

続いて、得られたブロック共重合体溶液に薬剤、例えば塩酸ドキソルピシンを添加すると、溶解し均一な溶液が得られる。さらにこの溶液は、安定性や他の必要性に応じ pH 調整をしても構わない。この際の pH 範囲は、薬剤が分解しなければ特に限定されないが、塩酸ドキソルピシンの場合、pH 4 ~ 7 が好ましい。

得られた複合体の溶液を濃縮することにより、溶液中に有機溶媒が含まれる場合には、この有機溶媒、たとえばエタノールが留去され、ブロック共重合体が形成する高分子ミセルの内核に薬剤が含有されたブロック共重合体-薬剤複合体が得られる。従って、従来の方法で行われていた透析、限外ろ過といった操作を行う必要がなくなった。こうして得られたブロック共重合体-薬剤複合体はレーザー光散乱により数十 nm の粒子径が確認され、高分子ミセルを形成していることが明らかとなり、ゲルろ過カラムを用いた内包薬剤の定量から、製造に用いた薬剤の内 80 % 以上の薬剤が内包されていることが確認された。

また、本発明では、更に得られたブロック共重合体－薬剤複合体を凍結乾燥することにより、凍結乾燥製剤とすることもできる。凍結乾燥の際、pHを一定にするために緩衝能をもった塩類、例えば、リン酸ナトリウムや酢酸ナトリウムなどを加えてもよい。

又、この凍結乾燥製剤は、例えば注射用水、生理食塩水、緩衝能を持たせた生理食塩水などに再溶解するとブロック共重合体－薬剤複合体溶液となる。

本製造法では、添加する薬剤が従来の製造法の様に製造操作過程で失われることはなく、薬剤が無駄にならないばかりか、ブロック共重合体に対する薬剤の内包率も高くすることが可能である。たとえば、特開平7-69900号公報の実施例に示されている製造法によれば、製造に用いたドキソルビシンの利用率および薬剤含有率は表1の通りであるが、後記の本製造法による実施例においては、表1に示すように薬剤の利用率および薬剤含有率ともに大幅に改善された。

表 1

	特開平7-69900号公報				本発明
	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	
トキソルビシン 利用率	87%	85%	72%	60%	95.70%
複合体の 薬剤含有率	3.91%	9.04%	2.83%	7.56%	16.31%

ブロック共重合体が形成するミセルに薬剤を含有させ、遊離の薬剤と比較して低い毒性の範囲で高い抗腫瘍効果を示すことがブロック共重合体－薬剤複合体の特徴であるが、薬剤内包率を上げるということは相対的に必要なブロック共重合体量が少量でよいことになり、経済性の点でも実用上優れている。

以下に本発明を実施例で示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1

上記一般式 (I) において  $R^1$  = メチル基、 $R^2$  = トリメチレン基、 $R^3$  = メチレン基、 $R^4$  = アセチル基、 $R$  = 水酸基またはドキシソルビシン残基 (ドキシソルビシンの結合している割合が平均 45%)、ポリエチレングリコールの平均分子量 5287、アスパラギン酸の平均ユニット数 28.1 であるブロック共重

合体 20.00 g に注射用水 100 mL を加え、35 °C に加温し懸濁させた。0.5 N 水酸化ナトリウム溶液を 6.0 mL 加え攪拌した後、無水エタノール 100 mL を加えた。ブロック共重合体が溶解したことを確認した後、塩酸ドキシソルピシン 3.906 g を添加し溶解させた。0.5 N 水酸化ナトリウム 5.9 mL を加え pH を 6 に調整し、注射用水 188 mL を加えた。1 時間後、溶液をメンブランフィルター（ミリポア；GV タイプ 0.22  $\mu$ m）にてろ過した後、減圧下溶媒を留去しブロック共重合体－薬剤複合体の溶液を得、更に凍結乾燥を行うことにより、ブロック共重合体－薬剤複合体の凍結乾燥物 22.96 g を得た。この複合体の薬剤含有量は 16.31 % であった。

#### 試験例 1

実施例 1 で調製した凍結乾燥物をリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4）に溶解し 1 mg/mL の溶液とした。この試料溶液を 5 °C にて 1 晩静置したのち、分析に使用した。水で膨潤させたセファデックス G-25（ファルマシア製：グレード、ファイン）約 2 mL をガラスカラムに充填した。このカラムに試料溶液を 200  $\mu$ L アプライした。水で展開し薬剤内包ミセル部



分を分取したのち、同量のジメチルホルムアミド（DMF）で希釈した後、水－DMF（１：１）溶液を用いて５mLにメスアップした（これを溶液１とした）。これとは別に、試料溶液２００μLを５mLメスフラスコにとり、水－DMF（１：１）溶液を用いて５mLにメスアップした（これを溶液２とした）。溶液１、２を、ミセル構造を壊す逆相HPLCにて分析し、得られたチャートのドキソルピシンのピーク面積の比（溶液１中の遊離ドキソルピシン量／溶液２中の遊離ドキソルピシン量）を計算した。実施例１で調製したブロック共重合体－薬剤複合体の薬剤内包率は９４．９％であった。この結果は、ブロック共重合体－薬剤複合体における薬剤が該ブロック共重合体の形成するミセルの内核に含有されていることを示している。

#### 逆相HPLCの分析条件

カラム Waters Symmetry C8  $\phi 4.6 \times 250$  mm

カラム温度 ４０℃

#### 溶離液

（Ａ）０．０５％MS－３＋０．０１％TFA（MS－３はジェールサイエンス製イオンペアー試薬、TFAはトリフルオロ酢酸）

(B)  $\text{CH}_3\text{CN}$

グラジエント

時間 (分)	0	20	25	35	50	51	60
B (%)	20	40	40	90	90	20	20
検出器	UV (485 nm)						
流速	0.8 mL / 分						
注入量	20 $\mu\text{L}$						

#### 応用例 1

メスの C D F 1 マウスの背側部皮下にマウス大腸癌 C o l o n 2 6 細胞を移植し、腫瘍の体積が  $100\text{ mm}^3$  前後に達した時点から実施例 1 で得られたブロック共重合体-薬剤複合体又は塩酸ドキソルピシンを静脈内に投与した。ブロック共重合体-薬剤複合体は、冷暗所に保存した凍結乾燥品をリン酸で緩衝能を持たせた生理食塩水 (pH 7.4) で溶解して投与し、その際の投与量は複合体中の薬剤量をもとに決定した。薬剤の抗腫瘍効果は、移植 60 日後の腫瘍消失 (治癒) マウス数と投与後 14 日目における腫瘍増殖阻害率から判定した。結果を表 2 に示す。

表 2

## マウス結腸癌 Colon 26 に対する効果

薬剤	投与量 (mg/kg)	T/C (%) <sup>a)</sup>	Cure/n <sup>b)</sup>	Tox. /n <sup>c)</sup>
対照群	0. 0	1 0 0	0 / 1 0	0 / 1 0
実施例 1 の高分子 - 薬剤複合体	3 0. 0	0. 3	9 / 1 0	0 / 1 0
	2 4. 0	0. 8	9 / 1 0	0 / 1 0
	1 9. 2	1. 4	8 / 1 0	0 / 1 0
塩酸ドキソルビシン	3 0. 0	9. 9	3 / 1 0	1 / 1 0
	2 4. 0	6. 4	4 / 1 0	0 / 1 0
	1 9. 2	1 3. 5	2 / 1 0	0 / 1 0

- a) : 投与後 1 4 日目の対照群に対する腫瘍体積比  
b) : 観察期間 6 0 日後に治癒していたマウス数 / 一群の匹数  
c) : 毒性死したマウス数 / 一群の匹数

塩酸ドキソルビシンをそのまま投与した場合と比べ、本発明のブロック共重合体-薬剤複合体として投与した場合の方が、全ての投与群でより強い腫瘍の縮小効果を示した。また、観察期間（60日）終了時の治癒マウス数は、塩酸ドキソルビシンをそのまま投与した群より多く、ブロック共重合体-薬剤複合体は、遊離の薬剤と比較して、低い毒性の範囲で高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

## 発明の効果

本発明のミセル型ブロック共重合体-薬剤複合体の製造法は透析、限外ろ過操作を含まないためその操作性も大幅に向上し、薬剤の利用率が高く、薬剤含量を高く且つ再現よくでき、従来

の製造法に比べて短時間で調製可能である。また、特殊な設備が必要ではなく多量の水を使用しなくてもよいことから、実施が容易で工業化する際に非常に優れた方法である。本発明により、低い毒性の範囲で高い抗腫瘍効果を示すブロック共重合体一薬剤複合体が経済的に、かつ簡便に提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 水、または水と混和する低沸点有機溶媒と水との混合溶媒に、親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるA B型ブロック共重合体と薬剤を溶解し、続いて溶液を濃縮する工程を含むことを特徴とするブロック共重合体－薬剤複合体の製造法。
2. 製造工程に透析又は限外ろ過工程を含まない請求項1記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法。
3. A B型ブロック共重合体における親水性高分子構造部分がポリエチレンオキシド誘導体であり、疎水性ポリアミノ酸構造部分が側鎖カルボキシル基にアントラサイクリン系抗癌剤が結合したアスパラギン酸を含むポリアスパラギン酸である請求項1又は2に記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法。
4. A B型ブロック共重合体における親水性高分子構造部分がポリエチレンオキシド誘導体であり、疎水性ポリアミノ酸構造部分が側鎖カルボキシル基にアントラサイクリン系抗癌剤が結合したグルタミン酸を含むポリグルタミン酸である請求項1又は2に記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法。

5. 疎水性ポリアミノ酸構造部分における側鎖カルボキシル基に結合したアントラサイクリン系抗癌剤がドキソルビシンである、請求項3又は4に記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法。

6. 薬剤がアントラサイクリン系抗癌剤である請求項1～5のいずれか1項に記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法。 . . . . .

7. アントラサイクリン系抗癌剤がドキソルビシンまたはその塩である請求項6に記載のブロック共重合体－薬剤複合体の製造法。

8. 水、または水と混和する低沸点有機溶媒と水との混合溶媒に、親水性高分子構造部分と疎水性ポリアミノ酸構造部分からなるAB型ブロック共重合体と薬剤を溶解し、続いて溶液を濃縮し、更に凍結乾燥する工程を含むことを特徴とするブロック共重合体－薬剤複合体を含む凍結乾燥製剤の製造法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/07730

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K47/30, 47/34, 9/127, 31/704, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K47/30, 47/34, 9/127, 31/704, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5449513 A (RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION OF JAPAN), 12 September, 1995 (12.09.95), Full text; particularly, example 4 & JP 6-107565 A	1-8
A	JP 7-69900 A (Yasuhisa SAKURAI), 14 March, 1995 (14.03.95), Full text (Family: none)	1-8
A	JP 5-955 A (Yasuhisa SAKURAI), 08 January, 1993 (08.01.93), Full text (Family: none)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 August, 2003 (07.08.03)

Date of mailing of the international search report  
26 August, 2003 (26.08.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/07730

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yasuhiro MATSUMURA, "Liposome to Micelle o Mochiita Koganzai no Koka Zokyo", Drug Delivery System, 2001, vol.16, No.5, pages 401 to 408	1-8



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K47/30, 47/34, 9/127, 31/704, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K47/30, 47/34, 9/127, 31/704, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US 5449513 A (RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION OF JAPAN) 1995. 09. 12, 全文, 特に実施例4 & JP 6-107565 A	1-8
A	JP 7-69900 A (桜井 靖久) 1995. 03. 14, 全文 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 5-955 A (桜井 靖久) 1993. 01. 08, 全文 (ファミリーなし)	1-8
A	松村 保広、リポソームとミセルを用いた抗がん剤の効果増強、 Drug Delivery System, 2001, Vol. 16, No. 5, pp401-408	1-8

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 08. 03

国際調査報告の発送日

26.08.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浜田 麻子



4C

2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451